

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> : C12N 1/06, C07K 3/08, 15/00 C07K 13/00, A61K 39/21, 39/145 G01N 33/569</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 94/00557 (43) Date de publication internationale: 6 janvier 1994 (06.01.94)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00654 (22) Date de dépôt international: 29 juin 1993 (29.06.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/08051 30 juin 1992 (30.06.92) FR (71) Déposant (FR seulement): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 15, quai Anatole-France, F-75700 Paris (FR). (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf FR US): PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, B.P. 7046, F-69348 Lyon Cédex 07 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MADJAR, Jean-Jacques [FR/FR]; 10, rue Bellecordière, F-69002 Lyon (FR). POLY, Hervé [FR/FR]; 3, rue Rigot-Vitton, F-69270 Fontaines-sur-Saône (FR).</p>	<p>(74) Mandataire: DEMACHY, Charles; Grosset-Fournier &amp; Demachy s.a.r.l., 103, rue La Fayette, F-75010 Paris (FR). (81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>	
<p>(54) Title: METHOD FOR PREPARING MEMBRANE PROTEINS AND PRESERVING THEIR OLIGOMERIC STRUCTURES UNDER DENATURING CONDITIONS, AND USES OF SAID PROTEINS IN DIAGNOSTICS AND VACCINATION</p> <p>(54) Titre: PROCÉDE D'OBTENTION DE PROTEINES MEMBRANAIRES, PERMETTANT LE MAINTIEN DES STRUCTURES OLIGOMERIQUES DE CES PROTEINES EN CONDITIONS DENATURANTES, ET UTILISATION DE CES PROTEINES DANS UN BUT DE DIAGNOSTIC OU DE VACCINATION</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A method for the lysis of micro-organisms such as viruses, in particular for preparing and, if required, purifying membrane proteins in said micro-organisms, wherein any proteins which may be present in oligomeric form are preserved in that form while the infectiousness of the micro-organisms is destroyed. Said method is characterized in that it includes the step of treating said micro-organisms with a composition containing a combination of at least two different amphipathic molecules. The use of the resulting oligomeric proteins in diagnostic methods or vaccine compositions is also disclosed.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention a pour objet un procédé de lyse de micro-organismes, tels que les virus, notamment aux fins d'obtention et, le cas échéant de purification des protéines à localisation membranaire chez ces micro-organismes, ce procédé permettant de maintenir sous forme oligomérique celles des protéines susceptibles d'être présentes sous une telle forme dans ces micro-organismes tout en détruisant le pouvoir infectieux de ces micro-organismes, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend une étape de traitement de ces micro-organismes à l'aide d'une composition contenant une association d'au moins deux molécules différentes au caractère amphipathique. L'invention vise également l'utilisation des protéines oligomériques obtenues par ce procédé pour la mise en œuvre de méthodes de diagnostic, ou dans des compositions vaccinales.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NE	Niger
BE	Belgique	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NO	Norvège
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IE	Irlande	PL	Pologne
BR	Brsil	IT	Italie	PT	Portugal
BY	Bélarus	JP	Japon	RO	Roumanie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SE	Suède
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	République slovaque
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
CN	Chine	LV	Lettonie	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TG	Togo
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DE	Allemagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

PROCEDE D'OBTENTION DE PROTEINES MEMBRANAIRES,  
PERMETTANT LE MAINTIEN DES STRUCTURES OLIGOMERIQUES DE  
CES PROTEINES EN CONDITIONS DENATURANTES, ET UTILISATION  
DE CES PROTEINES DANS UN BUT DE DIAGNOSTIC OU DE  
5 VACCINATION.

---

L'invention a pour objet un procédé d'obtention de protéines oligomériques,  
et plus particulièrement celles à localisation membranaire dans les cellules, micro-  
10 organismes (notamment les virus) ou hôtes cellulaires infectés par ces micro-  
organismes, ce procédé permettant le maintien de ces protéines sous forme  
oligomérique.

L'invention a également pour objet les utilisations de ces protéines  
oligomériques ainsi obtenues, notamment pour la mise en oeuvre de méthodes de  
15 diagnostic de pathologies causées par l'infection d'un individu par des micro-  
organismes porteurs de telles protéines, ou encore dans le cadre de la vaccination  
contre ce type d'infection.

De nombreuses protéines à localisation membranaire dans les cellules ou les  
micro-organismes sont sous forme oligomérique. A titre illustratif, on peut citer  
20 parmi les micro-organismes susceptibles de posséder des protéines oligomériques  
membranaires, les virus responsables du syndrome d'immunodéficience acquise  
(SIDA).

Dans le cas de la recherche d'une infection par HIV, une sérologie trouvée  
positive au dépistage, généralement par des tests de diagnostic de type ELISA, ne  
25 permet pas, à elle seule, d'affirmer la contamination par le virus. Deux méthodes  
concurrentes sont utilisées pour la confirmation. La première, réputée la plus  
performante, est connue sous l'abréviation de RIPA ("radio-immuno precipitation  
assay") car elle fait appel à l'immuno-précipitation des protéines virales  
préalablement marquées par un isotope radioactif (ici la <sup>35</sup>S-cystéine). La seconde  
30 méthode est désignée par l'expression "western blot". En pratique, elle met en  
oeuvre l'immuno-détection par les anticorps du sérum à analyser, des protéines  
virales séparées par électrophorèse et transférées sur une feuille de nitrocellulose  
ou tout autre support équivalent. Dans les deux cas, il faut cultiver le virus comme  
source d'antigène mais, le RIPA n'est réalisable qu'en laboratoire spécialisé ayant  
35 à sa disposition l'équipement et la structure permettant la culture et le marquage du  
virus en conditions réglementées, tandis que le "western blot" peut être utilisé dans  
n'importe quel laboratoire auquel est fourni la membrane portant les protéines  
antigéniques virales déjà séparées par électrophorèse.

La glycoprotéine de l'enveloppe de HIV-1 est codée par le gène "env", et la traduction de l'ARNm correspondant donne une protéine glycosylée, gp160, sous forme d'un précurseur dont la masse moléculaire est de 160 kDa. La gp160 est clivée à l'intérieur de la cellule pour donner, au niveau de la membrane cytoplasmique lors du bourgeonnement du virus en cours de formation, d'une part la gp120 que l'on retrouve à l'extérieur de la cellule et du virus, et, d'autre part, la gp41, partie transmembranaire de la glycoprotéine, qui correspond à l'extrémité carboxy-terminale du précurseur. Une fois la particule virale libérée, la gp41 seule protéine transmembranaire, présentera son extrémité carboxy-terminale tournée vers l'intérieur du virus et son extrémité amino-terminale faisant saillie à l'extérieur, se maintenant associée de façon non covalente à la gp120. La gp120 se comporte comme une molécule bi-fonctionnelle. Par son extrémité amino-terminale, elle est fixée à la gp41 alors que son extrémité carboxy-terminale reconnaît la région située entre les résidus 32 et 47 de la molécule CD4 (spécifique des lymphocytes T4 auxiliaires, macrophages...). La liaison de la gp120 au CD4 permet d'exposer la membrane de la cellule cible à la partie hydrophobe amino-terminale de la gp41, ce qui semble induire le mécanisme de fusion des membranes du virus et des cellules, cette fusion étant à l'origine de la pénétration du virion dans la cellule cible lors de l'infection (pour revues, voir Evans et Levy, 1989; Wong-Staal et Haseltine, 1992).

Ce processus de reconnaissance du récepteur viral, suivi de la fusion des membranes grâce à l'interaction de l'extrémité amino-terminale de la protéine de fusion avec la membrane de la cellule cible, n'est pas un mécanisme propre à HIV. Il est possible grâce à la présence, sous forme oligomérique, des glycoprotéines trans-membranaires du virus. Des pontages par agents chimiques ont permis de mettre en évidence des trimères au niveau des glycoprotéines de l'enveloppe de MuLV (Takemoto et col., 1978; Pinter et Fleissner, 1979), de MuMTV (Racevskis et Sarkar, 1980). Il a aussi été montré que la protéine de l'enveloppe de RSV forme des oligomères retrouvés dans les cellules infectées et les particules virales (Einfeld et Hunter, 1988). Le virus de l'influenza exprime également à sa surface une hémagglutinine sous forme trimérique (Doms et Helenius, 1986). Dans ce dernier cas, la forme multimérique est nécessaire au transport intracellulaire de la protéine (Copeland et col., 1986; Gething et col., 1986). L'influenza exprime aussi à sa surface une neuraminidase sous forme de tétramère (Varghese et col., 1983). Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) exprime également une glycoprotéine sous forme oligomérique et, dans ce cas, l'association des monomères est indispensable au transport de la protéine du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi (Kreis et Lodish, 1986). L'oligomérisation de la glycoprotéine

transmembranaire se retrouve également dans les paramyxovirus, tel que le virus de Sendai et dans le virus des oreillons.

Les auteurs de la présente invention ont mis en évidence le fait qu'il est possible, dans des conditions bien déterminées, et même en conditions dénaturantes, d'isoler des formes oligomériques de cette gp41 de HIV-1 (et plus particulièrement un trimère de 120kDa et un tétramère de 160kDa) qui sont donc des protéines différentes des gp120 et gp160 susmentionnées.

Les structures oligomériques des protéines, et plus particulièrement des protéines membranaires, représentent des formes moléculaires caractéristiques de certaines catégories de cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires infectés par ces micro-organismes, et sont par conséquent des composants particulièrement avantageux à utiliser:

- dans le cadre d'un dépistage de pathologies causées par l'infection d'un individu par ces micro-organismes (notamment par détection d'anticorps dirigés contre ces protéines dans les sérums des individus infectés), et plus spécifiquement dans le cadre d'un test de confirmation des méthodes classiques de dépistage de ces infections,

- ou encore dans le cadre de la vaccination destinée à prévenir de telles infections.

Toutefois, les méthodes existant actuellement pour l'isolement des protéines à partir de cellules ou micro-organismes, en vue notamment de leur obtention, détruisent ces structures oligomériques pour donner naissance à des formes monomériques dont l'utilisation ne permet pas toujours de conclure de façon certaine à une infection, ni d'obtenir une vaccination efficace contre ces infections.

Or la présente invention a précisément pour but de fournir un procédé d'isolement de protéines à partir de cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires infectés par ces micro-organismes, qui présente l'avantage de permettre le maintien sous forme oligomérique de celles des protéines existant sous une telle forme dans ces cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires infectés par ces micro-organismes.

L'invention a également pour but de mettre à la disposition du public des méthodes de diagnostic *in vitro*, notamment chez l'Homme, d'infections causées par ces micro-organismes, et plus particulièrement des tests de diagnostic et de confirmation, notamment dans le cadre de l'infection par HIV, qui soient plus performants et plus fiables que les méthodes de diagnostic ou tests de confirmation actuels.

L'invention a également pour but de fournir de nouvelles compositions vaccinales à base de protéines oligomériques, notamment dans le cadre de la vaccination contre les infections par HIV.

5 L'invention a également pour but de fournir des compositions pour la mise en oeuvre d'un tel procédé d'isolement de protéines sous forme oligomérique.

L'invention a pour objet un procédé de lyse de cellules ou de micro-organismes, notamment de virus, ou d'hôtes cellulaires infectés par ces micro-organismes, aux génomes modifiés ou non, ce procédé permettant de maintenir sous forme oligomérique celles des protéines susceptibles d'être présentes sous une  
10 telle forme dans les cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires susmentionnés, tout en détruisant le pouvoir infectieux de ces micro-organismes, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend une étape de traitement de ces cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires à l'aide d'une composition contenant une association d'au moins deux molécules différentes au caractère amphipathique,  
15 chacune de ces molécules comprenant une partie hydrophobe et une partie hydrophile.

Le procédé de l'invention permet avantageusement de détruire le pouvoir infectieux des micro-organismes, et plus particulièrement des virus (on parlera encore d'inactivation des particules infectieuses), tout en maintenant tout ou partie  
20 des propriétés immunogènes des protéines des micro-organismes, notamment grâce au maintien de leur structure oligomérique.

Par propriétés immunogènes des protéines, on entend plus particulièrement leurs propriétés d'induction de la formation d'anticorps, chez un individu, susceptibles de protéger ce dernier contre l'infection par le micro-organisme dont  
25 sont issues les protéines susmentionnées, ou par un micro-organisme apparenté.

L'inactivation des particules infectieuses est obtenue par solubilisation des protéines non oligomériques dont l'activité biologique est liée au pouvoir infectieux, notamment des protéines à activité polymérasique nécessaires à la réplique des particules virales, telles que l'ADN ou l'ARN polymérase.

30 Les protéines non oligomériques ainsi solubilisées dans le cadre du procédé de l'invention, perdent certaines de leurs propriétés physico-chimiques, dont celles liées au pouvoir infectieux des particules les contenant, tout en conservant tout ou partie de leurs propriétés immunogènes.

Une caractéristique particulièrement avantageuse de l'invention est que le  
35 procédé de lyse susmentionné est réalisable à température ambiante.

L'invention vise plus particulièrement l'application d'un tel procédé de lyse aux fins de séparation des protéines oligomériques à localisation membranaire dans

les cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires susmentionnés, aux fins d'obtention et, le cas échéant de purification de ces protéines.

Par séparation des protéines membranaires ci-dessus, il faut entendre la possibilité de séparer l'ensemble des différentes protéines oligomériques présentes  
5 dans le milieu sur lequel est appliqué le procédé de lyse susmentionné, des autres constituants, protéiques ou non, de ces cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires, et, le cas échéant, la possibilité de séparer ces différentes protéines oligomériques entre elles.

Si nécessaire, le procédé de l'invention comprend une étape supplémentaire  
10 de traitement par un agent chimique pontant tel que le formaldéhyde, cette étape étant effectuée après avoir utilisé le procédé de lyse susmentionné selon l'invention.

L'association des deux molécules amphipathiques utilisées dans le procédé de l'invention permet à la fois la solubilisation des protéines susceptibles d'être  
15 présentes sous forme oligomérique dans les cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires infectés par ces micro-organismes, et la reconstitution d'un environnement analogue à celui trouvé dans la membrane de ces cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires, cet environnement étant nécessaire au maintien de ces structures oligomériques. Un des mécanismes possibles à l'origine de la  
20 reconstitution d'un tel environnement serait que l'une de ces deux molécules soit un composé (ci-après désigné par premier composé) se substituant aux phospholipides et glycolipides membranaires, tandis que l'autre soit un composé (ci-après désigné par second composé) se substituant au cholestérol membranaire.

Le procédé de lyse de l'invention est davantage caractérisé en ce que l'une au  
25 moins des deux molécules de la composition utilisée pour le traitement des cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires, à savoir le premier composé susmentionné, possède la propriété, lorsqu'il est utilisé en dehors de l'association définie ci-dessus avec le second composé, de solubiliser l'ensemble des protéines présentes dans ces  
30 cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires, et de dissocier les protéines qui sont sous forme oligomérique (ce qui conduit aux structures monomériques de ces protéines), ce composé étant utilisé dans l'association définie ci-dessus avec le second composé dans des proportions telles qu'il conserve la propriété de solubiliser les protéines présentes dans ces cellules, micro-organismes ou hôtes  
35 cellulaires, et donc d'inactiver les particules infectieuses, tout en autorisant le maintien sous forme oligomérique de celles des protéines susceptibles d'être sous une telle forme dans ces cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires.

Avantageusement, le premier composé défini ci-dessus est constitué d'une ou plusieurs chaînes hydrocarbonées, hydrophobes saturées ou insaturées, ramifiées ou non, et d'une tête polaire reliant entre elles ou non ces chaînes hydrophobes.

Le premier composé est avantageusement choisi parmi les composés  
5 répondant à la formule suivante:

$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n\text{-R}$ , dans laquelle:

- R représente un groupe sulfate, phosphate, ou un halogène, notamment le chlore ou le brome,

- n est supérieur ou égal à 4, et de préférence compris entre 10 et 18.

10 De préférence le premier composé est choisi parmi les sels de dodécyl sulfate, notamment le dodécyl sulfate de sodium (SDS) ou de lithium. A titre illustratif, le premier composé peut également être choisi parmi les sels de dioctyl sulfosuccinate (de sodium par exemple), les sels de cetyltriméthylammonium (de brome par exemple), les sels de cétylpyridinium (de chlore par exemple), les N-  
15 dodécyl- ou N-tétradécyl-sulfobétaïne, l'octylglucoside, le lauryl maltoside, l'oxyde de lauryldiméthylamine, le décanoyl-N-méthylglucamide, et les polyéthylène glycol (n) lauryl éther.

Avantageusement le second composé utilisé dans l'association définie ci-dessus avec le premier composé, possède la propriété de solubiliser les protéines  
20 oligomériques membranaires en les maintenant sous forme oligomérique, tout en conservant tout ou partie de leur activité biologique, et plus particulièrement tout ou partie de leurs propriétés immunogènes.

Un second composé particulièrement avantageux a pour structure de base hydrophobe le noyau gonane, constitué de 4 noyaux cycliques A, B, C et D, à 17  
25 atomes de carbone, constituant la structure de base du cholestérol, portant ou non des groupements hydrocarbonés branchés en 10 ou en 13, ainsi que des groupements hydrophiles sur certains des 17 atomes de carbone, en alpha ou bêta, principalement en 3, 7, 12, estérifiés ou non, cette structure de base étant associée ou non à une autre tête polaire branchée sur le noyau cyclique D en 15, 16 ou 17,  
30 directement ou non par l'intermédiaire d'une chaîne hydrocarbonée.

Un second composé préféré est représenté par le 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylamino]-1-propane sulfonate (ou CHAPS), ou encore par le 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylamino]-2-hydroxy-1-propane sulfonate (ou CHAPSO).  
A titre illustratif le second composé peut également être choisi parmi les sels des  
35 acides biliaires, cholique et désoxycholique, chénodésoxycholique ou lithocholique (de sodium par exemple), les sels des acides biliaires conjugués taurocholique ou glycocholique (de sodium par exemple), et la digitonine.

Les différentes cellules sur lesquelles le procédé de l'invention peut être appliqué, sont représentées par toute cellule du corps humain ou animal ou encore les cellules végétales, aux génomes modifiés ou non, notamment par mise en oeuvre de manipulations génétiques ou par mutation. Ces cellules peuvent également être infectées par des micro-organismes tels que décrits ci-dessous.

Les micro-organismes sur lesquels le procédé de lyse de l'invention est susceptible d'être appliqué sont représentés notamment par les bactéries ou les virus humains ou animaux (ou encore de végétaux) présentant des glycoprotéines d'enveloppe susceptibles d'être sous forme oligomérique. Dans le cas où ces micro-organismes sont des virus, ces derniers peuvent être responsables de la fusion des membranes virus-hôte lors de l'infection, et sont plus particulièrement représentés par les rétrovirus humains du type HIV-1, HIV-2 et HTLV-I, HTLV-II, les myxovirus, notamment les virus de l'influenza, les paramyxovirus, notamment le virus des oreillons et le virus de la rougeole.

Le procédé de lyse selon l'invention est avantageusement appliqué aux différents types de virus responsables du SIDA, HIV 1 ou HIV-2 ou un mélange de ces derniers, en vue de la séparation, pour ce qui concerne HIV-1, d'une part de la protéine d'enveloppe transmembranaire de HIV-1, de 41kDa décrite ci-dessus et connue sous le nom de gp41 (responsable de la fusion des membranes avec les cellules cibles lors de l'infection), sous forme oligomérique, c'est à dire trimérique de 120kDa et plus particulièrement tétramérique de 160 kDa, et d'autre part des autres protéines entrant dans la composition du virion, notamment les produits des gènes viraux "gag", "pol" et "env", y compris la gp120 (autre produit de clivage décrit ci-dessus du précurseur de la protéine d'enveloppe gp160 et qui est responsable de la reconnaissance de la cellule cible CD4 positive) sous forme monomérique.

Pour ce qui concerne HIV-2, l'application du procédé de l'invention permet la séparation d'une part des formes oligomériques de la protéine d'enveloppe de 36kDa connue sous le nom de gp36 et, d'autre part des autres protéines constitutives du virion de façon analogue à celles de HIV-1.

Le procédé de lyse selon l'invention peut également être appliqué aux différents types de myxovirus responsables de la grippe ou influenza, avec possibilité de séparer, d'une part la protéine d'enveloppe HA aux propriétés hémagglutinantes sous forme oligomérique et plus particulièrement trimérique et, d'autre part, les autres protéines entrant dans la composition du virion, elles-mêmes sous forme oligomérique (comme la protéine NP par exemple) ou non oligomérique.

L'invention a également pour objet un procédé d'obtention de protéines sous leur forme oligomérique telle qu'existant dans la membrane de cellules ou dans la membrane de micro-organismes, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de lyse des cellules, des micro-organismes, notamment de virus, ou des hôtes cellulaires infectés par ces micro-organismes, suivant le procédé de l'invention décrit ci-dessus, le cas échéant suivie d'une étape de séparation proprement dite des protéines obtenues lors de l'étape précédente, notamment par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium par exemple, permettant la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire, les protéines sous forme oligomérique restant associées sous une telle forme.

Avantageusement le procédé susmentionné peut être utilisé dans le but d'obtenir lesdites protéines oligomériques sous forme purifiée, notamment en faisant suivre l'étape de lyse ou celle de séparation précédemment décrites, par une étape de purification, notamment par immuno-affinité ou par séparation moléculaire et recueil de la (ou des) fraction(s) contenant la (ou les) protéine(s) oligomérique(s) recherchée(s) purifiée(s).

Il va de soi que la réalisation, après l'étape de lyse susmentionnée, de la purification des protéines permet d'obtenir une composition comprenant différentes protéines oligomériques en association, tandis que la réalisation de cette étape de purification après celle de séparation permet d'obtenir des protéines oligomériques isolées et purifiées.

L'invention a également pour objet les protéines oligomériques telles qu'obtenues par mise en oeuvre du procédé susmentionné de l'invention.

L'invention vise plus spécifiquement le trimère de 120kDa et le tétramère de 160kDa de HIV-1 susmentionnés sous forme purifiée, ou encore les formes oligomériques de la gp36 de HIV-2 susmentionnées, tels qu'obtenus par mise en oeuvre du procédé de lyse de l'invention suivi d'une étape de purification, de la manière décrite ci-dessus, de ces protéines oligomériques ainsi obtenues, lesdites protéines présentant la caractéristique d'être stables à température ambiante en présence de quantités de SDS supérieures ou égales à environ 0,5%, notamment d'environ 1%, et de quantités de CHAPS qui soient au moins du même ordre que celles de SDS.

L'invention vise plus particulièrement des compositions de protéines sous forme oligomérique obtenues par mise en oeuvre d'un procédé tel que décrit ci-dessus de lyse de virus du type HIV, ou d'hôtes cellulaires susceptibles de contenir de tels virus, et le cas échéant purifiées, ces compositions comprenant soit des protéines oligomériques différentes entre elles en association, soit des protéines oligomériques identiques isolées.

L'invention vise notamment des compositions comprenant le trimère de la protéine d'enveloppe transmembranaire de HIV-1 de 41kDa (ou gp41), à savoir le trimère de 120kDa décrit ci-dessus, et/ou le tétramère de cette gp41, à savoir le tétramère de 160kDa décrit ci-dessus, et/ou une ou plusieurs formes oligomériques de la gp36 de HIV-2 susmentionnées.

L'invention vise encore des compositions comprenant les protéines oligomériques, et plus particulièrement trimérique, de la protéine HA des myxovirus tels que ceux responsables de la grippe ou influenza.

L'invention vise également l'application de compositions comprenant une ou plusieurs protéines oligomériques, et obtenues selon le procédé décrit ci-dessus pour la mise en oeuvre de méthodes de diagnostic ou de tests de confirmation in vitro de pathologies causées par l'infection d'individus (homme ou animal) par des micro-organismes susceptibles d'être porteurs de telles protéines oligomériques.

A ce titre, l'invention a pour objet toute méthode de diagnostic ou tout test de confirmation susmentionnés, et réalisés par détection des anticorps reconnus spécifiquement par ces protéines oligomériques et susceptibles d'être présents dans des échantillons biologiques, notamment dans du sérum, provenant d'individus eux-mêmes susceptibles d'être infectés par les micro-organismes en question (notamment ceux décrits ci-dessus).

L'invention concerne plus particulièrement toute méthode de diagnostic in vitro des infections causées par les différents virus du type HIV, et qui sont à l'origine du SIDA, chez l'Homme ou chez l'animal, ou tout test de confirmation de ces infections, comprenant le cas échéant une étape d'application du procédé de lyse de l'invention sur les virus du SIDA ou sur les cellules infectées par ces derniers susceptibles d'être contenus dans un échantillon biologique, notamment dans le sérum, prélevé chez un individu, et une étape de détection des anticorps susmentionnés à l'aide d'une ou plusieurs protéines sous forme oligomérique telles qu'obtenues par mise en oeuvre du procédé de lyse susmentionné.

L'invention a également pour objet toute composition comprenant:

- au moins un premier composé, choisi parmi ceux décrits ci-dessus, susceptible de solubiliser les protéines présentes dans des cellules, micro-organismes, notamment des virus, ou hôtes cellulaires infectés par ces micro-organismes, et de dissocier (lorsqu'il est utilisé seul ou en très large excès par rapport au second composé) les protéines qui sont sous forme oligomérique, en association avec

- au moins un second composé, choisi parmi ceux décrits ci-dessus, possédant la propriété de solubiliser les protéines oligomériques membranaires en

les maintenant sous forme oligomérique, tout en conservant tout ou partie de leurs propriétés immunogènes,

le premier composé étant utilisé dans l'association définie ci-dessus dans des proportions telles qu'il conserve la propriété de solubiliser les protéines présentes  
5 dans ces cellules, micro-organismes (notamment les protéines responsables de la réplication du génome de ces micro-organismes) ou hôtes cellulaires, tout en autorisant le maintien sous forme oligomérique de celles des protéines susceptibles d'être sous une telle forme dans ces cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires.

10 Une composition particulièrement préférée dans le cadre de la présente invention est telle que:

- le premier composé est constitué d'un sel de lithium ou de sodium de dodécyl sulfate,

- le second composé est le 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylamino]-1-propane sulfonate (ou CHAPS).

15

A titre illustratif, la quantité du premier composé, et plus particulièrement celle du SDS, représente de préférence environ 1,5 fois la quantité (en g/l) de protéines totales présentes dans l'échantillon biologique à traiter selon le procédé de lyse de l'invention.

20 Dans l'hypothèse où l'on se trouve en présence d'échantillon biologique où la concentration en protéines totales n'excède pas environ 3mg/ml, la concentration de SDS est avantageusement de l'ordre d'environ 5mg/ml.

De préférence, la quantité du second composé, et plus particulièrement du CHAPS, est au moins équivalente à celle du premier. Avantageusement, le second  
25 composé est utilisé dans un rapport équipondéral avec le premier composé.

Des compositions particulièrement préférées contiennent environ 0,5% à environ 1% de chacun des deux composés SDS et CHAPS.

L'invention a également pour objet tout procédé d'obtention des compositions décrites ci-dessus de l'invention, et comprenant à titre d'exemple le mélange du  
30 premier et du second composé tels que décrits ci-dessus, le cas échéant en solution aqueuse tamponnée.

L'invention vise également des trousse de réactifs (ou kits) pour la mise en oeuvre d'un procédé de lyse selon l'invention et comprenant une composition contenant en association un premier composé et un second composé tels que décrits  
35 ci-dessus.

L'invention concerne également des trousse de réactifs pour la mise en oeuvre de méthodes de diagnostic ou tests de confirmation tels que décrits ci-dessus, et comprenant une composition contenant une ou plusieurs protéines

oligomériques telles qu'obtenues par mise en oeuvre du procédé de lyse de l'invention, et, le cas échéant une composition contenant en association un premier composé et un second composé tels que décrits ci-dessus.

5 L'invention a également pour objet l'utilisation d'une ou plusieurs protéines oligomériques telles qu'obtenues par le procédé de lyse de l'invention, pour l'obtention de médicaments et compositions vaccinales destinés respectivement au traitement et à la prévention de pathologies causées par les infections par les micro-organismes porteurs de ces protéines oligomériques.

10 A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet des vaccins contre les différents virus du type HIV, et comprenant une ou plusieurs protéines telles qu'obtenues par mise en oeuvre du procédé de lyse de l'invention sur des virus du type HIV (notamment HIV-1 et HIV-2) ou sur des cellules infectées par ces virus.

15 L'invention vise plus particulièrement des compositions vaccinales comprenant le trimère de 120kDa et/ou le tétramère de 160kDa, et/ou les formes oligomériques de la protéine d'enveloppe de 36kDa susmentionnés, tels qu'obtenus par mise en oeuvre du procédé de lyse de l'invention sur des virus du type HIV-1 et/ou HIV-2, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

20 L'invention vise également des compositions vaccinales contre les différents virus responsables de la grippe ou influenza, comprenant une composition contenant les protéines oligomériques, et plus particulièrement trimérique, de la protéine HA, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de réalisation du procédé de lyse de l'invention pour l'obtention des protéines oligomériques de 120kDa et de 160kDa d'HIV-1 décrites ci-dessus.

25

## **I MATERIEL ET METHODES**

### **1-LIGNEES CELLULAIRES ET VIRUS**

#### **1-1 CEM**

30 Lignée lymphoblastique isolée à partir de sang périphérique d'une malade atteinte de leucémie lymphoblastique aiguë (T4+). Ces cellules proviennent de "l'American Tissue Culture Collection" (ATCC CC L 119) et portent la référence CCRS - CEM.

#### **1-2 CEM HIV**

35 Il s'agit de cellules CEM chroniquement infectées par l'isolat LAV BRU pour les CEM HIV-1 et par l'isolat ROD pour les CEM HIV-2.

### **1-3 PRODUCTION DE PARTICULES VIRALES**

Les lignées productrices sont cultivées à une densité de 1 à  $2 \cdot 10^6$  cellules/ml. Le milieu, contenant les particules virales produites, est renouvelé deux fois par jour et conservé à 4°C pendant au maximum 3 jours avant la purification.

#### 5            1-4 PURIFICATION DES PARTICULES VIRALES

Les surnageants sont traités de la façon suivante:

- une première centrifugation permet d'éliminer les débris cellulaires pendant 30 min à 3000 g,
- le surnageant est prélevé, les particules virales en suspension sont
- 10    sédimentées par centrifugation pendant 1,5 h à 100 000 g,
- les particules virales sont remises en suspension dans du TNE (Tris-HCl 0,02 M à pH7,5, NaCl 0,1 M, EDTA 0,001 M) et purifiées par centrifugation isopycnique en gradient discontinu de saccharose de 20 à 59% pendant 16 h à 280 000 g.

- 15        Le gradient est préparé à partir de cinq solutions de saccharose à 20, 30, 38,5, 47 et 59% (poids/volume). Il s'agit d'une centrifugation à l'équilibre dans un gradient de densité discontinue. Les particules vont donc traverser les couches successives du gradient jusqu'à ce qu'elles rencontrent un milieu de densité identique à leur propre densité ( $d = 1,13$ ).

- 20        Les particules virales sont recueillies au sommet de la fraction de saccharose à 38%. La fraction contenant les particules virales est diluée par deux volumes de TNE et centrifugée pour concentrer les virions pendant 3 h à 150 000g. Le culot, constitué de particules virales, est alors repris avec du TNE.

#### 25            2-SEPARATION DES PROTEINES PAR ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE DE SDS

##### 2-1 SOLUBILISATION DES PROTEINES VIRALES DANS LES CONDITIONS OPTIMISEES

Les protéines sont solubilisées dans le tampon d'échantillon suivant:

30	Tris-HCl pH 6,8	0,0625M
	DTE (dithioérythritol)	0,100M
	SDS	1%
	CHAPS	1%
	Glycérol	10%

## 2-2 CONDITIONS D'ELECTROPHORESE

Les gels de polyacrylamide sont coulés à température constante de 20°C. La séparation des protéines est effectuée en gel de polyacrylamide de 1 mm d'épaisseur composé successivement:

5 - d'un gel de résolution fait de:

Acrylamide	12,5 %
MBA (Méthylène Bisacrylamide)	0,4 %
Tris-HCl pH 8,8	0,375 M

- et d'un gel de concentration fait de:

10 Acrylamide	4 %
MBA	0,11 %
Tris-HCl pH 6,8	0,125 M

Tampons d'électrophorèse:

15 supérieur	Tris base	0,025M
	Glycine	0,192M
	SDS	0,1 %
inférieur	Tris base	0,025M
	Glycine	0,192M

20

Paramètres électriques:

500 volts (V)
0,5 ampères (A)
6 watts/plaque (W)
25 600 volts.heure (V/h)

Avec ces paramètres la migration s'effectue à puissance constante et prend fin lorsque les 600 volts heures sont atteints. La migration est effectuée à température contrôlée, constante à 20°C.

30

## 3-ELECTROTRANSFERT SUR NITROCELLULOSE

Les protéines séparées par électrophorèse sont ensuite électrotransférées sur une feuille de nitrocellulose ou tout autre support équivalent.

35

## 4-REVELATION DES PROTEINES TRANSFEREES

En fin de transfert la nitrocellulose est colorée avec une solution:

rouge Ponceau à 0,025 %  
acide trichloroacétique 3,5 %

Cette étape fixe les protéines sur la nitrocellulose mais permet aussi de colorer les protéines transférées et donc de vérifier la qualité du transfert. Cette coloration est labile à pH neutre.

5

### 5-IMMUNODETECTION

Toutes les étapes sont effectuées à température ambiante et sous agitation constante. Le rouge Ponceau est totalement éliminé par rinçage avec du PBS.

- La nitrocellulose est saturée 30 min dans une solution de lait écrémé à 1% dans du PBS.

- Fixation du premier anticorps contenu dans du sérum dilué au 1/100<sup>ème</sup> dans la solution de saturation, pendant 1 heure.

- La solution contenant le premier anticorps est éliminée et la nitrocellulose est rincée 3 fois 10 min avec une solution de Tween 20 à 0,1 % dans du PBS.

- le second anticorps est dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans du PBS/Tween 20 et incubé pendant 1 heure.

- La nitrocellulose est alors lavée 3 fois 10 min dans du PBS/Tween puis rincée rapidement dans du PBS.

- La révélation est effectuée dans une solution de NBT/BCIP ("nitro blue tetrazolium/5 bromo-4 chloro-3 indolyl phosphate"), la réaction est arrêtée dans de l'eau distillée.

### II-RESULTATS

Dans les conditions utilisant le procédé de l'invention de solubilisation des protéines virales, trois bandes correspondant aux produits de gène "env" peuvent être mises en évidence à 160, 120 et 41 kDa, laissant supposer, en première approche, qu'il s'agit respectivement:

- du précurseur, gp160;
- de la glycoprotéine externe gp120, permettant la reconnaissance du CD4;
- de la glycoprotéine transmembranaire gp41, permettant la fusion des membranes.

Dans ces conditions, toutefois, la gp41 apparaît toujours de faible intensité, alors que dans les conditions de solubilisation des protéines virales classiquement utilisées, la gp41 apparaît avec une plus grande intensité avec, en contre partie, une absence de gp160 et gp120.

Cependant les résultats obtenus avec des anticorps monoclonaux montrent que:

- la bande située à 120 kDa contient une protéine qui possède un épitope de la gp41, puisqu'un anticorps monoclonal anti-gp41 reconnaît à la fois les produits de 160 kDa et de 120 kDa,

- le même produit de 120 kDa est reconnu très faiblement par un anticorps monoclonal anti-gp120 qui lui-même ne reconnaît pas le produit qui devrait être son précurseur, la gp160.

Si on ne peut pas écarter l'hypothèse que l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal anti-gp120 ne soit pas accessible sur le précurseur gp160 non clivé, la présence d'un épitope de gp41 sur la gp120 ne peut, en revanche, pas être expliquée puisque ces deux protéines sont codées par des régions différentes du génome viral et qu'elles ne possèdent ni homologie de séquence ni réactivité immunologique croisée.

Par conséquent, tous les épitopes reconnus par ces anticorps monoclonaux anti-gp41 sont présents sur les produits de 120 à 160 kDa et les épitopes de la gp120 ne sont jamais détectés sur le produit de 160 kDa. Ceci suggère que les deux bandes mises en évidence en "western blot" à 120 et 160 kDa correspondent à des formes oligomériques de la gp41.

Cependant, les anticorps monoclonaux anti gp120 reconnaissent également un produit de 120 kDa. Il faut donc supposer que la bande mise en évidence par immunodétection avec un sérum positif, correspond à la détection de deux produits du gène "env", à savoir une forme multimérique de la gp41 associée à la glycoprotéine externe gp120. Ceci est compatible avec les résultats obtenus en "western blot" puisque, l'immunodétection effectuée avec les anticorps monoclonaux anti gp120 donne dans la région de 120 kDa une bande d'environ 1 mm, alors que sur la même membrane, un sérum positif donne dans cette région un signal beaucoup plus large de 3 à 4 mm environ. De plus, cette bande reconnue par l'anticorps anti gp 120 est non seulement plus fine mais également légèrement plus haute que la bande reconnue par l'anticorps monoclonal anti-gp41.

Ainsi le produit de 160 kDa mis en évidence sur les "western blots" préparés à partir de lysats de virus correspond-il à un tétramère de gp41 et la bande de 120 kDa correspond-elle à la fois à la gp120 et à un trimère de la gp41.

Le précurseur codé par le gène env (la gp160) ne serait pas présent dans la particule virale sous sa forme non clivée. Ce point est en accord avec les résultats de Pinter et col. (1989) qui, grâce à un anticorps monoclonal anti-gp120, mettent en évidence la présence de gp160 et de gp120 dans un lysat de cellules infectées, alors que le même anticorps ne reconnaît que la gp120 dans les particules virales.

L'addition de CHAPS ou 3-[(3-cholamidoproyl)-diméthylamino-1-propane sulfonate] au tampon de dissociation des particules virales apparaît directement

responsable du maintien des structures oligomériques des glycoprotéines de l'enveloppe virale. Le CHAPS est un détergent "zwitterionique" dont la structure est proche de celle du cholestérol et qui possède des propriétés proches de celles d'autres détergents ioniques, comme les cholates et deoxycholates. Le CHAPS permet une bonne solubilisation des protéines membranaires et empêche la formation d'aggrégats protéiques. Il a permis d'isoler des récepteurs membranaires sans en altérer les propriétés (affinités, spécificités), alors que ces récepteurs perdent leur propriété lorsqu'ils sont extraits avec d'autres détergents [Simonds et col., 1980; Sladeczek et col., 1984; Brose et col., 1992].

Dans le cas de HIV, l'effet stabilisateur du CHAPS sur la structure quaternaire du tétramère dépend de la concentration en CHAPS au moment de la dissociation des particules virales. Si le CHAPS est ajouté à des particules virales déjà dissociées par action du SDS, il ne permet pas la réassociation des monomères. Pour HIV, l'interaction gp41/CHAPS semble stabiliser la conformation oligomérique de la gp41, ce qui lui permet d'être parfaitement reconnue par les anticorps. Sans CHAPS et à 1% de SDS, les formes oligomériques sont progressivement dissociées, la dissociation étant accélérée par le traitement à 95°C. De plus, il a été montré que la concentration maximum de SDS tolérée par le tétramère de gp41 est de l'ordre de 0,1 à 0,15 %. Au-delà le tétramère est dissocié. Il semble cependant que les tétramères puissent résister à des concentrations plus élevées en SDS mais pendant un laps de temps très court (environ 5 min) [Pinter et col., 1989]. Ces résultats renforcent les observations effectuées au laboratoire avec la mise en évidence de la perte de réactivité antigénique au niveau des formes oligomériques de la gp41 par traitement de échantillons à 95°C en présence de 1% de SDS.

On peut donc supposer que lors du traitement de la particule virale par le tampon de solubilisation contenant à la fois du CHAPS et du SDS:

- le CHAPS prend la place du cholestérol membranaire avec une affinité pour les aminoacides hydrophobes impliqués dans l'interaction avec le cholestérol plus importante que celle, moins spécifique, du SDS pour ces mêmes aminoacides hydrophobes transmembranaires,

- tandis que le SDS prend la place des phospholipides et glycolipides membranaires,

- l'association SDS-CHAPS tendant à reconstituer l'environnement nécessaire au maintien des structures oligomériques des glycoprotéines transmembranaires.

Cependant, un excès de SDS ou le chauffage prolongé au moment de la solubilisation déplacent l'interaction en faveur du SDS qui prend alors, de façon irréversible, la place du CHAPS.

### III TEST D'IMMUNOGENICITE CHEZ LA SOURIS

#### - Obtention de la préparation vaccinale

5

Le virus grippal purifié par ultracentrifugation sur gradient de saccharose est remis en-suspension en tampon phosphate (PBS) à pH 7,4 à la concentration de 3 mg de protéines totales/ml (dosage protéique selon Bradford, 1976).

Après sonication, le virus est traité pendant 18h à 37°C par un égal volume  
10 d'une solution de détergents contenant 1 % de SDS et 1 % de CHAPS en tampon PBS à pH 7,4, DTE (dithioerythritol) 0,02 M. On recherche l'absence de virus résiduel par inoculation de 0,2 ml de la préparation virale non diluée ou diluée à 1/10 dans la cavité allantoïque d'oeufs de poule embryonnés de 10 jours; en cas  
15 d'activité infectieuse résiduelle, on peut effectuer une étape supplémentaire d'inactivation par traitement au formaldéhyde à 0,01 % final pendant 24 h à température ambiante.

#### - Protocole d'immunisation

20

Des souris BALB/c (IFFA-CREDO France) âgées de 6 semaines sont immunisées par voie sous-cutanée, sous un volume de 0,5 ml, avec les doses de 0-0,1-1-10 et 100µg de protéines totales de la préparation virale inactivée obtenue précédemment; ces doses sont préparées par dilution de la préparation dans du tampon PBS pH 7,4. Elles sont administrées sans adjuvant. Chaque groupe  
25 expérimental est constitué de 10 animaux recevant chacun une dose identique d'antigène.

Deux schémas d'immunisation sont effectués parallèlement qui comportent ou non une injection de rappel: 28 jours après immunisation, les groupes d'animaux recevant une seule injection sont saignés, ceux qui subissent une injection de rappel  
30 reçoivent une injection de même dose que lors de la primo-immunisation et sont ensuite saignés 15 jours après le rappel. Les prélèvements de sang sont effectués à la carotide, sous anesthésie des souris à l'éther.

#### - Analyse des sérums

35

Les sérums sont analysés pour leur contenu en anticorps inhibant l'activité hémagglutinante du virus grippal (anticorps IHA). (il est admis qu'ils ont, chez l'homme, une signification protectrice vis-à-vis de la souche d'immunisation pour des taux d'ordre de 40-80).

Les sérums sont préalablement débarrassés de leurs inhibiteurs non spécifiques par traitement à la neuraminidase de choléra (Receptor Destroying Enzyme, RDE), suivi si nécessaire par un traitement au métapériodate de potassium.

- 5        La réaction d'inhibition d'hémagglutination (Palmer et al., 1975) met en présence à volume égal (sous 50  $\mu$ l, en tampon PBS) des dilutions de raison 2 des sérums traités, le virus grippal dilué de façon à contenir 4 unités hémagglutinantes, et des globules rouges de poule à 0,5 %. Le titre du sérum en anticorps IHA est donné par l'inverse de la dernière dilution qui inhibe l'activité hémagglutinante du  
10 virus.

### BIBLIOGRAPHIE

- 15        - Bradford (1976). Anal. Biochem. 72, 248-354.

- Brose, N., Petrenko, A.G., Südhof, T.C. et Jahn, R. (1992). "Synaptogamin: A calcium sensor on the synaptic vesicle surface". Science 256, 1021-1025.

20

- Copeland, C.S., Doms, R.W., Bolzau, E.M., Webster, R.G. et Helenius, A. (1986). "Assembly of influenza hemagglutinin trimers and its role in intracellular transport". J. Cell Biol. 103, 1179-1191.

- 25        - Doms, R.W. et Helenius, A. (1986). "Quaternary structure of influenza virus hemagglutinin after acidic treatment". 60, 833-839.

- Einfeld, D. et Hunter, E. (1988). "Oligomeric structure of a prototype retrovirus glycoprotein". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8688-8692.

30

- Evans, L.A. et Levy, J.A. (1989). "Characteristics of HIV infection and pathogenesis". Biochim. Biophys. Acta 989, 237-254.

- Gething, M.J., McCammon, K. et Sambrook, J. (1986). "Expression of  
35 wild-type and mutant forms of influenza hemagglutinin: the role of folding in intracellular transport". Cell 46, 939-950.

- Kreis, T.E. et Lodish, H.F. (1986). "Oligomerization is essential for transport of vesicular stomatitis viral glycoprotein to the cell surface". *Cell* 46, 929- 937.
- 5       - Pinter, A. et Fleissner, E. (1979). "Structural studies of retroviruses: characterization of oligomeric complexes of murine and feline leukemia virus envelope and core components formed upon cross-linking". *J. Virol.* 30, 157-165.
- 10       - Palmer et al. (1975). "Haemagglutination-inhibition test". *Advanced laboratory technicals for immunological diagnostic* (Ed. Welfare P.H.S., Atlanta), Immunology Ser. N° 6, Procedural guide Part 2, 25-62.)
- 15       - Pinter, A., Honnen, W.J., Tilley, S.A., Bona, C., Zaghouani, H., Gorny, M.K. et Zolla-Pazner, S. (1989). "Oligomeric structure of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1". 63, 2674-2679.
- 20       - Racevskis, J. et Sarkar, N.H. (1980). "Murine mammary tumor virus structural protein interactions: formation of oligomeric complexes with cleavable cross-linking agents". *J. Virol.* 35, 937-948.
- Simonds, W., Koski, G., Streaty, R.A., Hjelmeland, L.M. et Klee, W.A. (1980). "Solubilisation of active opiate receptors". *Proc. Natl. Sci. Acad. USA* 77, 4623-4627.
- 25       - Sladeczek, F., Bockaert, J. et Rouot, B. (1984). "Solubilization of a adrenoreceptor with a zwitterionic detergent: preservation of agonist binding and its sensitivity to GTP". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1116-1121.
- 30       - Takemoto, L.J., Fox, C.S., Jensen, F.C., Elder, J.H. et Lerner, R.A. (1978). "Nearest neighbor interactions of the major RNA tumor virus glycoprotein on murine cell surfaces". *Proc. Natl. Sci. Acad. USA* 75, 3644-3648.
- 35       - Varghese, J.N., Lavef, W.G. et Colman, P.M. (1983). "Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2,9 Å resolution". *Nature* 303, 35-40.

- Wong-Staal, F. et Haseltine, W.A. (1992). "Regulatory genes of Human Immunodeficiency Viruses". in Molecular Genetic Medicine, Vol.2, Friedman, T. ed., PP 189-219.

## REVENDICATIONS

5

1. Procédé de lyse de cellules ou de micro-organismes, tels que les virus, ou d'hôtes cellulaires infectés par ces micro-organismes, aux génomes modifiés ou non, notamment aux fins d'obtention et, le cas échéant de purification des protéines à localisation membranaire chez ces cellules, micro-organismes ou hôtes  
10 cellulaires, ce procédé permettant de maintenir sous forme oligomérique celles des protéines susceptibles d'être présentes sous une telle forme dans les cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires susmentionnés, tout en détruisant le pouvoir infectieux de ces micro-organismes, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend une étape de traitement de ces cellules, micro-organismes ou hôtes  
15 cellulaires à l'aide d'une composition contenant une association d'au moins deux molécules différentes (désignées respectivement par premier et second composés) au caractère amphipathique, chacune comprenant une partie hydrophobe et une partie hydrophile.

20

2. Procédé de lyse selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'une au moins des deux molécules, à savoir le premier composé, possède la propriété, lorsqu'il est utilisé en dehors de l'association avec le second composé, de solubiliser les protéines présentes dans ces cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires, et de dissocier les protéines qui sont sous forme oligomérique, ce  
25 composé étant utilisé dans l'association définie dans la revendication 1 avec le second composé dans des proportions telles qu'il conserve la propriété de solubiliser les protéines présentes dans ces cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires tout en autorisant le maintien sous forme oligomérique de celles des protéines susceptibles d'être sous une telle forme dans ces cellules, micro-  
30 organismes ou hôtes cellulaires.

35

3. Procédé de lyse selon la revendication 2, caractérisé en ce que le premier composé, est constitué d'une ou plusieurs chaînes hydrocarbonées, hydrophobes saturées ou insaturées, ramifiées ou non, et d'une tête polaire reliant entre elles ou non ces chaînes hydrophobes.

4. Procédé de lyse selon la revendication 3, caractérisé en ce que le premier composé est choisi parmi les composés répondant à la formule suivante:

$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n\text{-R}$ , dans laquelle:

- R représente un groupe sulfate, phosphate, ou un halogène, notamment le chlore ou le brome,
- n est supérieur ou égal à 4, et de préférence compris entre 10 et 18.

5. Procédé de lyse selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le second composé utilisé dans l'association définie dans la revendication 1, possède la propriété de solubiliser les protéines oligomériques membranaires en les maintenant sous forme oligomérique, tout en conservant tout ou partie de leurs propriétés immunogènes.

6. Procédé de lyse selon la revendication 5, caractérisé en ce que le second composé a pour structure de base hydrophobe le noyau gonane, constitué de 4 noyaux cycliques A, B, C et D, à 17 atomes de carbone, constituant la structure de base du cholestérol, portant ou non des groupements hydrocarbonés branchés en 10 ou en 13, ainsi que des groupements hydrophiles sur certains des 17 atomes de carbone, en alpha ou bêta, principalement en 3, 7, 12, estérifiés ou non, cette structure de base étant associée ou non à une autre tête polaire branchée sur le noyau cyclique D en 15, 16 ou 17, directement ou non par l'intermédiaire d'une chaîne hydrocarbonée.

7. Procédé de lyse selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le premier composé est le sodium dodécyl sulfate (ou SDS) et le second composé est le 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylamino-1-propane sulfonate] (ou CHAPS).

8. Procédé de lyse selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est appliqué sur des cellules humaines, animales ou végétales, ou sur des micro-organismes ou des hôtes cellulaires infectés par ces micro-organismes, notamment par des virus humains, animaux ou végétaux, présentant des protéines, notamment des glycoprotéines d'enveloppe, susceptibles d'être sous forme oligomérique et, le cas échéant, responsables de la fusion des membranes virus-hôte lors de l'infection.

9. Procédé de lyse selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il est appliqué sur des rétrovirus humains du type HIV-1, HIV-2 et HTLV-I,

HTLV-II, les myxovirus, notamment les virus de l'influenza, les paramyxovirus, notamment le virus des oreillons et le virus de la rougeole.

10. Procédé de lyse selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce  
5 qu'il est appliqué aux différents types de virus responsables du SIDA, HIV-1 ou HIV-2 ou un mélange de ces derniers, en vue de la séparation, pour ce qui concerne HIV-1, d'une part la protéine d'enveloppe transmembranaire de HIV-1, de 41kDa connue sous le nom de GP41 (responsable de la fusion des membranes avec les cellules cibles lors de l'infection), sous forme oligomérique, c'est à dire  
10 trimérique de 120kDa et plus particulièrement tétramérique de 160 kDa, et d'autre part les autres protéines entrant dans la composition du virion, notamment les produits des gènes viraux "gag", "pol" et "env", y compris la gp120 (autre produit de clivage du précurseur de la protéine d'enveloppe gp160 et qui est responsable de la reconnaissance de la cellule cible CD4 positive) sous forme monomérique, et,  
15 pour ce qui concerne HIV-2, d'une part les formes oligomériques de la protéine d'enveloppe de 36kDa connues sous le nom de gp36 et, d'autre part les autres protéines constitutives du virion de façon analogue à celles d'HIV-1.

11. Procédé de lyse selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce  
20 qu'il est appliqué aux différents types de myxovirus responsables de la grippe ou influenza, avec possibilité de séparer, d'une part la protéine d'enveloppe HA aux propriétés hémagglutinantes sous forme oligomérique et plus particulièrement trimérique et, d'autre part, les autres protéines entrant dans la composition du virion.

25

12. Procédé d'obtention de protéines sous leur forme oligomérique telle qu'existante dans la membrane cellulaire ou dans la membrane des micro-organismes, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de lyse des cellules, des micro-organismes, notamment de virus, ou des hôtes cellulaires infectés par ces  
30 micro-organismes, suivant le procédé selon l'une des revendications 1 à 11, le cas échéant suivie d'une étape de séparation proprement dite des protéines obtenues lors de l'étape précédente, notamment par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium par exemple, permettant la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire, les protéines sous forme  
35 oligomérique restant associées sous une telle forme, cette dernière étape ou l'étape de lyse précédente étant elles-mêmes le cas échéant suivie d'une étape de purification de la protéine ou des protéines ainsi obtenues.

13. Protéines oligomériques telles qu'obtenues par mise en oeuvre d'un procédé selon l'une des revendications 1 à 12.

14. composition de protéines oligomériques telles selon la revendication 13, comprenant le trimère de la protéine d'enveloppe transmembranaire de HIV-1 de 41kDa (ou gp41), à savoir le trimère de 120kDa décrit ci-dessus, et/ou le tétramère de cette gp41, à savoir le tétramère de 160kDa, et/ou une ou plusieurs formes oligomériques de la gp36 d'HIV-2.

15. Composition de protéines oligomériques selon la revendication 13, comprenant la protéine d'enveloppe HA aux propriétés hémagglutinantes sous forme oligomérique et plus particulièrement trimérique, des myxovirus responsables de la grippe ou influenza.

16. Méthode de diagnostic in vitro de pathologies causées par l'infection d'individus (homme ou animal) par des micro-organismes, notamment par les virus du type HIV, cette méthode comprenant une étape de détection des anticorps reconnus spécifiquement par les protéines oligomériques telles qu'obtenues par le procédé selon l'une des revendications 1 à 13, notamment par les protéines selon la revendication 14, ces anticorps étant susceptibles d'être présents dans des échantillons biologiques, notamment dans du sérum, provenant d'individus eux-mêmes susceptibles d'être infectés par les micro-organismes en question.

17. Composition vaccinnante contre les différents virus du type HIV, comprenant une composition selon la revendication 14, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

18. Composition vaccinnante contre les différents virus responsables de la grippe ou influenza, comprenant une composition selon la revendication 15, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

19. Composition caractérisée en ce qu'elle comprend:

- au moins un premier composé susceptible de solubiliser les protéines présentes dans des cellules, micro-organismes, notamment des virus, ou hôtes cellulaires infectés par ces micro-organismes, et de dissocier (lorsqu'il est utilisé seul ou en très large excès par rapport au second composé) les protéines qui sont sous forme oligomérique, en association avec

- au moins un second composé possédant la propriété de solubiliser les protéines oligomériques membranaires en les maintenant sous forme oligomérique, tout en conservant leurs propriétés immunogènes,

le premier composé étant utilisé dans l'association définie ci-dessus avec dans  
5 des proportions telles qu'il conserve la propriété de solubiliser les protéines présentes dans ces cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires, tout en autorisant le maintien sous forme oligomérique de celles des protéines susceptibles d'être sous une telle forme dans ces cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires.

10

20. Composition selon la revendication 19, caractérisée en ce que le premier composé est le sodium dodécyl sulfate (ou SDS) et le second composé est le 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylamino-1-propane sulfonate] (ou CHAPS).

15

21. Composition selon la revendication 19 ou 20, caractérisée en ce que la quantité du premier composé, et plus particulièrement celle du SDS, représente de préférence environ 1,5 fois la quantité (en g/l) de protéines totales présentes dans l'échantillon biologique à traiter selon le procédé de lyse défini dans l'une des revendications 1 à 13.

20

22. Composition selon l'une des revendications 19 à 21, caractérisée en ce que la quantité du second composé, et plus particulièrement du CHAPS, est au moins équivalente à celle du premier.

25

23. Composition selon l'une des revendications 19 à 22, caractérisée en ce que le SDS et le CHAPS sont utilisés dans un rapport équipondéral, et contient de préférence environ 0,5% à environ 1% de chacun de ces deux composés.

30

24. Trousses de réactifs (ou kits) pour la mise en oeuvre d'un procédé selon l'une des revendications 1 à 13 et comprenant une composition selon l'une des revendications 19 à 23.

35

25. Trousses de réactifs pour la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic selon la revendication 16, comprenant une composition contenant une ou plusieurs protéines oligomériques telles qu'obtenues par le procédé selon l'une des revendications 1 à 13, notamment une composition selon la revendication 14, et le cas échéant une composition selon l'une des revendications 19 à 23.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00654

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>5</sup> C12N1/06; C07K3/08; C07K15/00; C07K13/00  
A61K39/21; A61K39/145; G01N33/569  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>5</sup> C12N; C07K; A61K; G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0295859 (BUNGE (AUSTRALIA) PROPRIETARY LIMITED) 21 December 1988 see column 4, line 21 - line 43 see column 7, line 8 - line 26; claims	1-24
Y	WO,A,9106646 (TRITON BIOSCIENCES INC.) 16 May 1991 see page 5, line 15 - line 22; claims	1-24
Y	EP,A,0382875 (MATUO) 22 August 1990 see the whole document	1-24
P,Y	DE,A,300690 (HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN) 02 July 1992 see the whole document	1-24
A	EP,A,0334278 (W.BREDT ET AL.) 27 september 1989 see the whole document	1-9 ./...

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 October 1993 (07.10.93)

Date of mailing of the international search report

14 October 1993 (14.10.93)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE  
Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00654

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,9013314 (INSTITUT PASTEUR) 15 November 1990 see abstract; claims ---	11-18,24
A	EP,A,0321606 (IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT FÜR CHEMISCHE-MEDIZINISCHE PRODUKTE) 28 June 1989 ---	
A	US,A,4752473 (D.P. NAYAK & M.A. JABBAR) 21 June 1988 see column 5, line 36 - line 45; claims ---	15,18
A	EP,A,0366239 (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 02 May 1990 see claims ---	1,15,18
A	WO,A,9114449 (INSTITUT PASTEUR) 03 October 1991 see abstract; claims -----	13-14,17

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9300654  
SA 75842

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 07/10/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0295859	21-12-88	AU-A- 1763288	15-12-88
		JP-A- 1047389	21-02-89
		US-A- 4992531	12-02-91
WO-A-9106646	16-05-91	US-A- 5215963	01-06-93
		AU-A- 7039491	31-05-91
		AU-B- 640480	26-08-93
		AU-A- 7740691	31-05-91
		CA-A- 2067766	25-04-91
		CA-A- 2069965	25-04-91
		EP-A- 0497866	12-08-92
		EP-A- 0524173	27-01-93
		JP-T- 5505097	05-08-93
		WO-A- 9106647	16-05-91
EP-A-0382875	22-08-90	JP-A- 1047435	21-02-89
DD-A-300690		None	
EP-A-0334278	27-09-89	DE-A- 3809796	05-10-89
		AU-A- 3158189	28-09-89
		JP-A- 2036193	06-02-90
		US-A- 5084561	28-01-92
WO-A-9013314	15-11-90	FR-A- 2646854	16-11-90
		US-A- 5208321	04-05-93
		EP-A- 0424519	02-05-91
		JP-T- 3506042	26-12-91
		CA-A- 2032505	13-11-90
EP-A-0321606	28-06-89	JP-A- 2000798	05-01-90
US-A-4752473	21-06-88	None	
EP-A-0366239	02-05-90	AU-B- 640348	26-08-93
		AU-A- 4022589	08-03-90
		JP-A- 3130087	03-06-91
WO-A-9114449	03-10-91	AU-A- 7498991	21-10-91
		EP-A- 0472706	04-03-92

FR 9300654  
SA 75842

07/10/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9114449		JP-A- 3271233	03-12-91
		JP-T- 4506220	29-10-92
-----			

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

PCT/FR 93/00654

Demande Internationale No

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB 5 C12N1/06; A61K39/21;	C07K3/08; A61K39/145; C07K15/00; G01N33/569 C07K13/00	
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>		
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12N ; C07K ; A61K ; G01N	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie <sup>o</sup>	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, <sup>12</sup> des passages pertinents <sup>13</sup>	No. des revendications visées <sup>14</sup>
Y	EP,A,0 295 859 (BUNGE (AUSTRALIA) PROPRIETARY LIMITED) 21 Décembre 1988 voir colonne 4, ligne 21 - ligne 43 voir colonne 7, ligne 8 - ligne 26; revendications ---	1-24
Y	WO,A,9 106 646 (TRITON BIOSCIENCES INC.) 16 Mai 1991 voir page 5, ligne 15 - ligne 22; revendications ---	1-24
Y	EP,A,0 382 875 (MATUO) 22 Août 1990 voir le document en entier ---	1-24
	-/--	
<p><sup>o</sup> Catégories spéciales de documents cités:<sup>11</sup></p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
07 OCTOBRE 1993		14.10.93
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS		Signature du fonctionnaire autorisé BEVAN S.R.

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS <sup>14</sup>		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie <sup>o</sup>	Identification des documents cités, <sup>16</sup> avec indication, si nécessaire des passages pertinents <sup>17</sup>	No. des revendications visées <sup>18</sup>
P,Y	DD,A,300 690 (HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN) 2 Juillet 1992 voir le document en entier ---	1-24
A	EP,A,0 334 278 (W. BREDT ET AL.) 27 Septembre 1989 voir le document en entier ---	1-9
A	WO,A,9 013 314 (INSTITUT PASTEUR) 15 Novembre 1990 voir abrégé; revendications ---	11-18,24
A	EP,A,0 321 606 (IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT FÜR CHEMISCHE-MEDIZINISCHE PRODUKTE) 28 Juin 1989 ---	
A	US,A,4 752 473 (D.P. NAYAK & M.A. JABBAR) 21 Juin 1988 voir colonne 5, ligne 36 - ligne 45; revendications ---	15,18
A	EP,A,0 366 239 (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 2 Mai 1990 voir revendications ---	1,15,18
A	WO,A,9 114 449 (INSTITUT PASTEUR) 3 Octobre 1991 voir abrégé; revendications -----	13-14,17

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9300654  
SA 75842

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

07/10/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0295859	21-12-88	AU-A- 1763288	15-12-88
		JP-A- 1047389	21-02-89
		US-A- 4992531	12-02-91
-----			
WO-A-9106646	16-05-91	US-A- 5215963	01-06-93
		AU-A- 7039491	31-05-91
		AU-B- 640480	26-08-93
		AU-A- 7740691	31-05-91
		CA-A- 2067766	25-04-91
		CA-A- 2069965	25-04-91
		EP-A- 0497866	12-08-92
		EP-A- 0524173	27-01-93
		JP-T- 5505097	05-08-93
		WO-A- 9106647	16-05-91
-----			
EP-A-0382875	22-08-90	JP-A- 1047435	21-02-89
-----			
DD-A-300690		Aucun	
-----			
EP-A-0334278	27-09-89	DE-A- 3809796	05-10-89
		AU-A- 3158189	28-09-89
		JP-A- 2036193	06-02-90
		US-A- 5084561	28-01-92
-----			
WO-A-9013314	15-11-90	FR-A- 2646854	16-11-90
		US-A- 5208321	04-05-93
		EP-A- 0424519	02-05-91
		JP-T- 3506042	26-12-91
		CA-A- 2032505	13-11-90
-----			
EP-A-0321606	28-06-89	JP-A- 2000798	05-01-90
-----			
US-A-4752473	21-06-88	Aucun	
-----			
EP-A-0366239	02-05-90	AU-B- 640348	26-08-93
		AU-A- 4022589	08-03-90
		JP-A- 3130087	03-06-91
-----			
WO-A-9114449	03-10-91	AU-A- 7498991	21-10-91
		EP-A- 0472706	04-03-92

EPO FORM P0472

FR 9300654  
SA 75842

07/10/93

EPO FORM P0472